นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อ clinical isolates ของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย[1] และ หลิน กิจพิพิธ[2]

Abstract

Voravuthikunchai, S.[1] and Kitpipit, L.[2]

Antibacterial activity of crude extracts of Thai medicinal plants against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 2): 525-534

Aqueous and ethanolic extracts of *Acacia catechu, Garcinia mangostana, Impatiens balsamina, Peltophorum pterocarpum, Psidium guajava, Punica granatum, Quercus infectoria, Tamarindus indica, Uncaria gambir, Walsura robusta* were primarily tested for their antibacterial activities against 35 clinical isolates of methicillin-resistant *S. aureus* and *S. aureus* ATCC 25923 using disc diffusion method (2.5 mg/disc). Almost all extracts, except *Tamarindus indica* exhibited antibacterial activity. Both aqueous and ethanolic extracts of *Acacia catechu, Psidium guajava, Punica granatum, Quercus infectoria,* and *Uncaria gambir*, and ethanolic extracts of *Garcinia mangostana, Impatiens balsamina, Peltophorum pterocarpum,* and *Walsura robusta* demonstrated inhibition zones, ranging from 6 to 22 mm.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla, 90112 Thailand.

[1]Ph.D.(Microbiology), รองศาสตราจารย์ [2]นักศึกษาหลักสูตร วท.บ. สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: supayang.v@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 19 สิงหาคม 2547 รับลงพิมพ์ 10 มกราคม 2548

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values were performed using agar dilution method. The MIC/MBC values of aqueous extracts of *Quercus infectoria* against clinical isolates of MRSA and *S. aureus* were 0.2 to 0.4/0.4 to 1.6 and 0.2/1.6 mg/ml, respectively. Ethanolic extracts of *Garcinia mangostana, Punica granatum* and *Quercus infectoria* were demonstrated to be the most effective. The MIC values against MRSA isolates and *S. aureus* ranged from 0.05 to 0.4 and 0.1, 0.2 to 0.4 and 0.1, 0.2 to 0.4 and 0.2 mg/ml, respectively. The MBC values against MRSA ranged from 0.1 to 0.4, 0.4 to 1.6, and 1.6 to 3.1 mg/ml and against *S. aureus* at 0.4, 3.2, and 1.6 mg/ml, respectively.

Key words : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, *S. aureus*, medicinal plants, herbs

บทคัดย่อ

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย และ หลิน กิจพิพิธ

ฤทธิ์ต้านเชื้อของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อ clinical isolates ของ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 2): 525-534

ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยน้ำและสารสกัดหยาบด้วย ethanol จากพืชสมุนไพรไทย 10 ชนิด ได้แก่ สีเสียดเหนือ (*Acacia catechu*) มังคุด (*Garcinia mangostana*) เทียนบ้าน (*Impatiens balsamina*) นนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ทับทิม (*Punica granatum*) ฝรั่ง (*Psidium guajava*) เบญกานี (*Quercus infectoria*) มะขาม (*Tamarindus indica*) สีเสียดเทศ (*Uncaria gambir*) และ ขี้อ้าย (*Walsura robusta*) ต่อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 35 isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้น 2.5 มก./แผ่น พบว่าสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรเกือบทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียยกเว้นมะขาม สารสกัดหยาบด้วยน้ำและสารสกัดหยาบด้วย ethanol จากสีเสียดเทศ ฝรั่ง ทับทิม เบญกานีและสีเสียดเหนือ และสารสกัดหยาบด้วย ethanol จาก มังคุด เทียนบ้าน นนทรี และขี้อ้าย ให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA และ *S. aureus* โดยมีขนาดของ inhibition zone 6 ถึง 22 มม.

จากการทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) โดยวิธี agar dilution พบว่าสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเบญกานีมีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ MRSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดี โดยมีค่า MIC/MBC อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.4/0.4 ถึง 1.6 มก./มล. และ 0.2/1.6 มก./มล. ตามลำดับ สารสกัดหยาบด้วย ethanol ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ MRSA ที่แยกจากโรงพยาบาลได้ดี ได้แก่ มังคุด เบญกานีและทับทิม โดยมีค่า MIC ต่อ MRSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ระหว่าง 0.05 ถึง 0.4 และ 0.1, 0.2 ถึง 0.4 และ 0.1, 0.2 ถึง 0.4 และ 0.2 มก./มล. และค่า MBC ต่อ MRSA อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.4, 0.4 ถึง 1.6, 1.6 ถึง 3.2 มก./มล. และต่อ *S. aureus* ที่ 0.4, 1.6, 3.2 มก./มล. ตามลำดับ

Staphylococcus aureus เป็นสาเหตุสำคัญอันดับต้นๆ ของการติดเชื้อในโรงพยาบาล โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีบาดแผลหรือผู้ป่วยหลังผ่าตัด เชื้อนี้จะรุกล้ำเข้าไปในเนื้อเยื่อทำให้เกิดหนองและอาจทำให้เนื้อเยื่อตาย และเชื้ออาจเข้าสู่กระแสโลหิต (bacteremia) ทำให้การติดเชื้อแพร่ไปในระบบต่างๆ ของร่างกาย เกิดเป็นภาวะโรคแทรกซ้อนรุนแรงจนถึงชีวิตได้ เช่น เยื่อบุหัวใจอักเสบ (pericarditis) ปอดบวม (pneumonia) และการติดเชื้อในกระดูก นอกจากนี้เชื้อสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ภาวะ toxic shock syndrome (TSS)

จาก *S. aureus* ซึ่งมักเกิดกับหญิงที่ใช้ผ้าอนามัยแบบสอด และการติดเชื้อหลังคลอด ทำให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้

ก่อนปี ค.ศ. 1959 มีรายงานเกี่ยวกับ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin (methicillin-resistant *S. aureus* หรือ MRSA) น้อยมาก ทำให้ไม่มีความสำคัญทางคลินิกมากนัก ตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1968 มีรายงานเกี่ยวกับ MRSA บ่อยมากขึ้นในประเทศอังกฤษ และเริ่มเป็นปัญหาที่มีความสำคัญทางคลินิก ปัจจุบันพบว่า MRSA เป็นเชื้อที่ระบาดได้ง่าย และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญในผู้ป่วยที่มีบาดแผลไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก มักพบการระบาดในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ และจากโรงพยาบาลหนึ่งไปอีกโรงพยาบาลหนึ่ง หรือแม้แต่จากผู้ป่วยเตียงหนึ่งไปยังเตียงข้างเคียง นอกจากนี้ยังมีการแพร่ระบาดทางอากาศและจากการสัมผัสโดยตรง โดยรับเชื้อมาจากบุคคลที่เป็นพาหะ ซึ่งอาจเป็นตัวผู้ป่วยหรือบุคลากรของโรงพยาบาล และพบบ่อยที่สุดจากการสัมผัสโดยตรง MRSA เป็นแบคทีเรียที่มีการดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะยาในกลุ่ม β-lactam กลไกการดื้อยาของ MRSA ในปัจจุบันเชื่อว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ penicillin-binding proteins (PBPs)

การดื้อยาของแบคทีเรียเป็นปัญหาที่สำคัญของมนุษย์โลกที่จำเป็นต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ในปัจจุบันพบว่า MRSA ก่อให้เกิดการติดเชื้อทั้งในและนอกโรงพยาบาล (Sarava *et al.*, 1982) นอกจากนี้ MRSA ยังดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ทำให้เป็นปัญหาในการรักษา (Thornsberry, 1988; Tenover *et al.*, 2001; Leclercq, 2002; Burns, 2003)

พืชชั้นสูงเป็นแหล่งสำคัญของสารสกัดจากธรรมชาติ (Press, 1996) พืชสมุนไพรไทยมีสารประกอบทางเคมีหลายชนิด ในตำรายาพื้นบ้าน ได้มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคติดเชื้อมาเป็นระยะเวลานาน ปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์ศึกษาสมุนไพรชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อ นอกจากนี้สมุนไพรมีราคาถูกกว่ายาปฏิชีวนะ มีความปลอดภัยสูงและโอกาสที่เชื้อจะดื้อต่อสมุนไพรมีน้อยมาก

งานวิจัยนี้ได้การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบสมุนไพรไทยในการต้าน MRSA เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้และพัฒนาต่อไปในอนาคต นำ MRSA 35 สายพันธุ์ (PSU 0201 ถึง PSU 0235) และ *S. aureus* ATCC 25923 มาทดสอบกับสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทย 10 ชนิด ด้วยน้ำและ ethanol ซึ่งได้มีรายงานว่ามีฤทธิ์ดีต่อ pathogenic bacteria (Voravuthikunchai *et al.*, 2004b) ได้แก่ สีเสียดเหนือ (*Acacia catechu*) มังคุด (*Garcinia mangostana*) เทียนบ้าน (*Impatiens balsamina*) นนทรี (*Peltophorum pterocarpum*) ฝรั่ง (*Psidium guajava*) ทับทิม (*Punica granatum*) เบญกานี (*Quercus infectoria*) มะขาม (*Tamarindus indica*) สีเสียดเทศ (*Uncaria gambir*) และ ขี้อ้าย (*Walsura robusta*)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อต้องการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ MRSA และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการพิจารณาที่จะใช้สารสกัดสมุนไพรเหล่านี้ในการพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคติดเชื้อจาก MRSA ต่อไป

วัสดุและวิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

1.1 ขั้นตอนการสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรมาบด สับให้ละเอียดและทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่

1) การสกัดด้วยน้ำ

นำสมุนไพรมาชั่งหาน้ำหนักเริ่มต้น เติมน้ำจนท่วมนำไปต้มให้เดือด 10 นาที นำสารสกัดที่ได้มากรอง แล้วนำน้ำที่ได้ไประเหยโดยใช้ความร้อนจากไอน้ำ จะได้สารสกัดซึ่งมีลักษณะหนืด มีสีน้ำตาลหรือสีดำ

2) การสกัดด้วย ethanol

นำสมุนไพรมาชั่งหาน้ำหนักเริ่มต้น เติม 95% ethanol จนท่วม แช่ทิ้งไว้พร้อมเขย่า นาน 5 ถึง 7 วัน นำน้ำที่แช่สมุนไพรมากรอง ระเหยโดยใช้ vacuum rotary evaporator และทำให้แห้งโดยวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C

Table 1. List of medicinal plants used in the antimicrobial assay.

Botanical species	Family	Plant parts	Extract yield (%)	
			Aqueous	Ethanolic
Acacia catechu (L.F.) Willd.	Fabaceae	wood	6.0	5.6
Garcinia mangostana L.	Clussiaceae	fruit shell	NA	ND
Impatiens balsamina L.	Balsaminaceae	leaf	NA	ND
Peltophorum pterocarpum (D.C.) Backer ex K.Heyne	Fabaceae	Bark	8.6	7.1
Psidium guajava L.	Myrtaceae	leaf	2.8	8.0
Punica granatum L.	Punicaceae	fruit shell	8.0	13.0
Quercus infectoria Oliv.	Fagaceae	fruit	37.8	32.4
Tamarindus indica L.	Fabaceae	leaf	37.1	4.8
Uncaria gambir (L.) Hunter (L.) Roxb.	Rubiaceae	leaf, stem	59.8	65.4
Walsura robusta Roxb.	Meliaceae	wood	2.3	4.3

NA = Not applicable

คำนวณหาค่า extract yield (%) ของสารสกัดด้วยน้ำและ ethanol ดังแสดงค่าใน Table 1

1.2 การเตรียมสารละลายของสารสกัด

ชั่งสารสกัด 0.25 กรัม ใส่ในขวดที่ sterile แล้วเติม dimethy sulfoxide (DMSO, Merck) 1 มล. จะได้สารสกัดมีความเข้มข้น 250 มก./มล. ตรวจเช็ค sterility ของสารสกัด โดย streak บน nutrient agar (NA, Difco) บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง สารสกัดที่มีเชื้อปนเปื้อนนำไปกรองโดยใช้แผ่นกรอง membrane filter ที่มีขนาด 0.45 μm

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

2.1 การเตรียม inoculum

clinical isolates ของ MRSA รวม 35 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในการศึกษานำเชื้อ MRSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งไวต่อยา methicillin มาเพาะเลี้ยงบน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเขี่ยเชื้อ 4 ถึง 5 โคโลนี นำมาเลี้ยงใน Mueller Hinton broth (MHB, Difco) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลาย barium sulfate McFarland no. 0.5 โดยใช้ sterile sodium chloride 0.85% ใช้ micropipette ดูดเชื้อ 10 μl ลงบน Mueller Hinton agar (MHA, Difco) เกลี่ยเชื้อแบบถี่ๆ ให้ทั่ว plate ด้วย sterile cotton swab

2.2 การทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (NCCLS, 2000)

ใช้ forcep คีบแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานวางบน MHA ในข้อ 2.1 ให้แผ่นยาห่างกันประมาณ 15 ถึง 20 มม. และห่างจากขอบจานอาหาร 15 มม. โดยทำการทดสอบกับยาปฏิชีวนะ chloramphenicol (30 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), kanamycin (30 μg), oxacillin (1 μg), tetracycline (30 μg) และ vancomycin (30 μg) นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยใช้ Vernier caliper วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน เพื่อแปลผลว่าเชื้อไว (susceptible) หรือดื้อยาปฏิชีวนะ (resistant) การทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐานทำ 2 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.3 การเตรียมสารสกัดแบบแผ่นแห้ง

นำ sterile paper disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม.) วางบนตะแกรงลวดที่ sterile ใน sterile petri dish ดูดสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 250 มก./มล. ปริมาตร 10 μl หยดตรงกลางแผ่น disc จะได้ปริมาณสารสกัด 2.5 มก./แผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ

2.4 การเตรียมสารสกัดแบบแผ่นเปียก

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดแบบแผ่นแห้ง แต่จะวางบน MHA ที่ลงเชื้อตามที่เตรียม ไว้ในข้อ 2.1 ทันที

2.5 การทดสอบกับสารสกัด

ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และ 2.2 แต่ใช้สารสกัดแทนยาปฏิชีวนะ การทดสอบทำ 2 ซ้ำ

3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) ใช้วิธี agar dilution (ดัดแปลงจาก NCCLS, 2000)

3.1 การเตรียม inoculum

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบน NA ให้ได้ single colony นำเชื้อ 4 ถึง 5 colony มาเลี้ยงใน MHB นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลาย barium sulfate McFarland no. 0.5 โดยใช้ sterile sodium chloride 0.85%

3.2 การเตรียมสารสกัด

คัดเลือกเฉพาะสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีจากการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี disc diffusion โดยดูจากขนาดของ inhibition zone ที่มากกว่า 10 มม. นำมาเตรียมสารสกัดสมุนไพรให้มีความเข้มข้น 250 มก./มล. เจือจางสารสกัดสมุนไพรแบบ 2-fold serial dilution ด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 250 ถึง 0.122 มก./มล.

3.3 การทดสอบหาค่า MIC

นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับ MHA หลอมเหลว ปริมาตร 6 มล. ในอัตราส่วน 1:10 เท MHA ลงใน sterile petri dish (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม.) ตั้งทิ้งไว้ให้ agar แข็งตัว จากนั้นวางแผ่นกรอง filter membrane (ขนาด 0.45 μm) บนผิวหน้า MHA แล้วหยดเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบตามวิธีการที่เตรียม inoculum ปริมาตร 1 μl ลงบนแผ่นกรองและนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16 ถึง18 ชั่วโมง ส่วน control ใช้ DMSO แทนสารสกัด อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ การทดสอบหาค่า MIC ทำ 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ฆ่าแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration, MBC) Lorian, 1996

นำแผ่นกรอง membrane filter ที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ในการทดลองหาค่า MIC มาวางเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MHA ใหม่ บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย การทดสอบหาค่า MBC ทำ 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

ผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion

1.1 ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อแผ่นยามาตรฐาน

ทำการทดสอบความไวของ MRSA 35 สายพันธุ์ (PSU 0201 ถึง PSU 0235) และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยวางแผ่นยามาตรฐาน 7 ชนิด ได้แก่ chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, kanamycin, oxacillin, tetracycline และ vancomycin จากการทดสอบสามารถสรุปผลโดยเทียบจากค่ามาตรฐานของ NCCLS, 2000 (Table 2) พบว่า MRSA ทั้ง 35 สายพันธุ์ มีลักษณะการดื้อยาปฏิชีวนะแบบ mutidrug-resistance erythromycin และ oxacillin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA ทั้ง 35 สายพันธุ์ แต่ทุกสายพันธุ์ยังไวต่อ vancomycin มีเพียง 3 สายพันธุ์ที่ไวต่อแผ่นยามาตรฐาน 4 ชนิด (chloramphenicol, gentamicin, kanamycin และ vancomycin) ได้แก่ PSU 0202, PSU 0223, PSU 0225 MRSA 28 สายพันธุ์ที่ไวต่อแผ่นยามาตรฐาน 2 ชนิด ได้แก่ chloramphenicol และ vancomycin (PSU 0203 ถึง PSU 0205, PSU 0207, PSU 0209, PSU 0211 ถึง PSU 0222, PSU 0224, PSU 0226 ถึง PSU0235) และ MRSA 1 สายพันธุ์ (PSU 0206) ไวต่อแผ่นยามาตรฐาน 2 ชนิดได้แก่ chloramphenicol และ tetracycline MRSA 3 สายพันธุ์ (PSU 0201, PSU

Table 2. Antibiotic sensitivity patterns of 35 clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Strains	Chloramphenicol	Erythromycin	Gentamicin	Kanamycin	Oxacillin	Tetracycline	Vancomycin
PSU 0201	8+ (R)	-	-	-	-	9 (R)	16 (S)
PSU 0202	24 (S)	9 (R)	22 (S)	21 (S)	-	10 (R)	17 (S)
PSU 0203	25 (S)	9 (R)	-	-	-	8 (R)	17 (S)
PSU 0204	24 (S)	9 (R)	-	-	-	8 (R)	16 (S)
PSU 0205	26 (S)	10 (R)	-	-	-	10 (R)	16 (S)
PSU 0206	25 (S)	10 (R)	-	-	-	27 (S)	12 (I)
PSU 0207	24 (S)	7 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0208	8 (R)	7 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0209	23 (S)	10 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0210	7 (R)	9 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0211	25 (S)	6 (R)	-	-	-	8 (R)	20 (S)
PSU 0212	26 (S)	8 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0213	23 (S)	9 (R)	-	-	-	9 (R)	21 (S)
PSU 0214	23 (S)	8 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0215	23 (S)	8 (R)	-	-	-	9 (R)	21 (S)
PSU 0216	23 (S)	8 (R)	-	-	-	9 (R)	21 (S)
PSU 0217	23 (S)	8 (R)	-	-	-	8 (R)	19 (S)
PSU 0218	24 (S)	8 (R)	-	-	-	8 (R)	19 (S)
PSU 0219	25 (S)	8 (R)	-	-	-	8 (R)	20 (S)
PSU 0220	26 (S)	9 (R)	-	-	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0221	24 (S)	8 (R)	-	-	-	8 (R)	19 (S)
PSU 0222	24 (S)	7 (R)	-	-	-	-	19 (S)
PSU 0223	27 (S)	9 (R)	24 (S)	24 (S)	-	9 (R)	20 (S)
PSU 0224	25 (S)	8 (R)	-	-	-	8 (R)	19 (S)
PSU 0225	26 (S)	9 (R)	23 (S)	24 (S)	-	9 (R)	19 (S)
PSU 0226	24 (S)	-	-	-	-	-	19 (S)
PSU 0227	24 (S)	-	-	-	-	-	20 (S)
PSU 0228	26 (S)	-	-	-	9 (R)	9 (R)	21 (S)
PSU 0229	25 (S)	-	-	-	-	-	20 (S)
PSU 0230	25 (S)	-	-	-	7 (R)	7 (R)	20 (S)
PSU 0231	26 (S)	-	-	-	-	-	19 (S)
PSU 0232	26 (S)	-	-	-	-	-	19 (S)
PSU 0233	26 (S)	-	-	-	-	-	20 (S)
PSU 0234	25 (S)	-	-	-	8 (R)	8 (R)	20 (S)
PSU 0235	24 (S)	-	-	-	9 (R)	9 (R)	20 (S)
S. aureus ATCC 25923	21 (S)	22 (S)	23 (S)	20 (S)	25 (S)	25 (S)	15 (S)
%Resistant strains	8.57	100	91.42	91.42	100	97.14	0

+ = Inhibition zone (mm), S = Susceptible, R = Resistant, I = Intermediate, - = No inhibition zone.

0208, PSU 0210) ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดที่ทดสอบ ยกเว้น vancomycin ส่วน *S. aureus* ATCC 25923 ไวต่อแผ่นยามาตรฐานทุกชนิดที่ทดสอบ

1.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดหยาบ 6 ชนิด ซึ่งสกัดด้วยน้ำได้แก่ ทับทิม เบญกานี ฝรั่ง มะขาม สีเสียดเทศ และสีเสียดเหนือ และสกัดโดยใช้ ethanol 10 ชนิด ได้แก่ ขี้อ้าย ทับทิม เทียนบ้าน นนทรี เบญกานี ฝรั่ง มะขาม สีเสียดเทศ สีเสียดเหนือ ที่ความเข้มข้น 2.5 มก./แผ่น มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยวิธี disc diffusion ทั้งแบบแผ่นเปียกและแบบแผ่นแห้ง พบว่าสารสกัดหยาบด้วย ethanol และสารสกัดหยาบด้วยน้ำเกือบทุกสารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MRSA และ *S. aureus* ยกเว้นมะขามเพียงชนิดเดียวที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ *S. aureus*

Table 3. Antibacterial activity of aqueous and ethanolic extracts of medicinal plant species (concentration 2.5 mg/disc).

Medicinal plants	X±S.E. Inhibition zone (mm)			
	Aqueous extract		Ethanolic extract	
	MRSA	*S. aureus* ATCC 25923	MRSA	*S. aureus* ATCC 25923
Acacia catechu	8.83±0.35*	7	10.67±0.19	10
	9.17±0.35+	6	19.25±1.24	10
Garcinia mangostana	ND	ND	10.43±0.20	11
			11.51±0.17	12
Impatiens balsamina	ND	ND	9.42±0.19	6
			9.75±0.25	8
Peltophorum ptercarpum	ND	ND	11.00±0.24	12
		ND	12.08±0.15	13
Psidium guajava	14.42±0.55	13	9.75±0.18	11
	15.00±0.62	14	9.92±0.29	10
Punica granatum	15.75±0.43	15	16.70±0.17	17
	17.92±0.34	16	18.53±0.57	18
Quercus infectoria	18.50±0.57	17	17.97±0.24	17
	19.85±0.61	18	19.23±0.20	18
Tamarindus indica	ND	ND	ND	ND
Uncaria gambir	13.08±0.53	13	19.33±0.26	17
	16.50±0.46	14	21.50±0.48	19
Walsura robusta	ND	ND	10.25±0.28	12
			12.25±0.25	12

*** = Dry disc, + = Wet disc, - = No inhibition zone, ND = Not done.**

สารสกัดหยาบด้วยน้ำและสารสกัดหยาบด้วย ethanol จากสีเสียดเทศ ฝรั่ง ทับทิม เบญกานี และสีเสียดเหนือ และสารสกัดหยาบด้วย ethanol จาก มังคุด เทียนบ้าน นนทรี และขี้อ้าย ทั้งแบบเปียกและแบบแห้งสามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ *S. aureus* ได้ผลดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มม. สารสกัดของสมุนไพรทุกชนิดที่นำมาทดสอบแบบแผ่นเปียกให้ผลดีกว่าหรือเท่ากับสารสกัดแผ่นแห้ง (Table 3)

2. การทดสอบค่า MIC และ MBC โดยวิธี agar dilution

จากการหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบจากเบญกานีมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ MRSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC ของ MRSA 35 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 0.2 ถึง 0.4 มก./มล. และค่า MIC ที่ 0.2 มก./มล. สำหรับ *S. aureus*

สารสกัดหยาบด้วย ethanol จากเปลือกมังคุดให้ค่า MIC ที่ต่ำที่สุดต่อเชื้อ MRSA และ *S. aureus*

เบญกานีและทับทิมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีมากเป็นลำดับรอง (Table 4)

ผลการทดสอบหาค่า MBC พบว่าค่า MBC ของสารสกัดหยาบด้วยน้ำจากเบญกานีต่อเชื้อ MRSA อยู่ในช่วง 0.4 ถึง 1.6 มก./มล. และ *S. aureus* อยู่ที่ 1.6 มก./มล.

ค่า MBC ของสารสกัดหยาบด้วย ethanol พบว่ามังคุดให้ผลดีที่สุด โดยมีค่า MBC ต่อเชื้อ MRSA อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.4 มก./มล. และ 0.4 มก./มล. สำหรับ *S. aureus*

Table 4. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of crude medicinal plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.*

Medicinal plant extracts	MIC and MBC values (mg/ml)			
	Aqueous extract		Ethanolic extract	
	MRSA	*S. aureus* ATCC 25923	MRSA	*S. aureus* ATCC 25923
Acacia catechu	6.3-12.5*/12.5-25+	3.2/25	1.6/3.2-25	1.6/12.5
Garcinia mangostana	ND	ND	0.05-0.4/0.1-0.4	0.1/0.4
Impatiens balsamina	ND	ND	6.3/25	6.3/25
Peltophorum ptercarpum	ND	ND	0.1-0.8/6.3	0.1/3.2
Psidium guajava	0.8-1.6/6.3	0.8/6.3	0.2-1.6/6.3	0.2/1.6
Punica granatum	0.4-1.6/6.3-12.5	0.4/6.3	0.2-0.4/1.6-3.2	0.2/3.2
Quercus infectoria	0.2-0.4/0.4-1.6	0.2-0.4/1.6	0.2-0.4/0.4-1.6	0.1/1.6
Tamarindus indica	ND	ND	ND	ND
Uncaria gambir	6.3-12.5/12.5/25	3.2/25	0.4-=0.8/3.2	0.4/3.2
Walsura robusta	ND	ND	ND	ND

*** = MIC range, + = MBC, ND = Not done.**

เบญกานีและทับทิมให้ผลดีเป็นอันดับรองลงมา โดยมีค่า MBC อยู่ในช่วง 0.4 ถึง 1.6 มก./มล. และ 1.6 ถึง 3.2 มก./มล. ต่อเชื้อ MRSA และ 1.6 มก./มล. และ 3.2 มก./มล. ต่อ *S. aureus* ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้สารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร 10 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่สกัดด้วยน้ำ 6 ชนิด ได้แก่ ทับทิม เบญกานี ฝรั่ง มะขาม สีเสียดเทศและสีเสียดเหนือ และเป็นสารสกัดด้วย ethanol 10 ชนิด ได้แก่ ขี้อ้าย ทับทิม เทียนบ้าน นนทรี เบญกานี ฝรั่ง มะขาม มังคุด สีเสียดเทศ และสีเสียดเหนือ ทดสอบเบื้องต้นโดยใช้สารสกัดทุกชนิดกับ MRSA 12 สายพันธุ์ ได้แก่ PSU 0201 ถึง PSU 0212 และ *S. aureus* ATCC 25923 และทำการคัดเลือกเฉพาะสมุนไพรที่มีศักยภาพสูง ซึ่งได้แก่ สารสกัดด้วยน้ำของทับทิมและเบญกานี สารสกัดด้วย ethanol ของทับทิม เบญกานี และสีเสียดเหนือ ในการต้านเชื้อมาทดสอบกับสายพันธุ์ PSU 0213 ถึง PSU 0235 ต่อไป

สารสกัดหยาบของสมุนไพรด้วย ethanol และน้ำรวม 16 สารสกัด (คิดเป็น 87.5%) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง MRSA ได้ทุกสายพันธุ์ รวมทั้ง 3 สายพันธุ์ (PSU 0201, PSU 0208, PSU 0210) ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดที่ทดสอบ ยกเว้น vancomycin มะขามเป็นพืชสมุนไพรชนิดเดียวที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ สารสกัดที่ให้ขนาดของ inhibition zone กว้าง ได้แก่ สารสกัดด้วยน้ำจากทับทิม เบญกานี ฝรั่ง สีเสียดเหนือ และสารสกัดด้วย ethanol จากทับทิม เบญกานี และสีเสียดเหนือ สารสกัดทั้งแบบแผ่นเปียกและแบบแผ่นแห้งให้ผลใกล้เคียงกัน แต่แบบแผ่นเปียกให้ขนาดของ inhibtion zone กว้างกว่าแผ่นแห้งเล็กน้อย Voravuthikunchai และคณะ (2004c) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของสมุนไพรไทย 58 ชนิด กับเชื้อ enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 พบเพียง 24.14% ของสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกรัมลบได้ ได้มีรายงานอื่นๆ ว่าแบคทีเรียกรัมบวกไวต่อสารสกัดจากพืชมากกว่าแบคทีเรียกรัมลบ (Brantner *et al.*, 1996; Ojala *et al.*, 2000)

Navarro และคณะ (1996) ได้รายงานค่า MIC ของ MRSA ต่อสารสกัดจากทับทิมในช่วง 0.62 ถึง 1.25 มก./มล. จากการศึกษาครั้งนี้ค่า MIC ที่ได้มีค่าที่ดีกว่าประมาณ 6.2 เท่า แต่มีค่า MBC ที่ใกล้เคียงกันคือ 2.5 มก./มล.

Machado และคณะ (2003) รายงานค่าของสารสกัด ethanol จากทับทิมที่ 0.2 มก./มล. และจากการศึกษาของ Voravuthikunchai และคณะ (2004b) พบว่าสารสกัดจาก gall ของเบญกานีและเปลือกผลทับทิมด้วย ethanol ต่อเชื้อ *S. aureus* และ MRSA และมีค่า MIC และ MBC ที่ใกล้เคียงกันกับการทดลองในครั้งนี้ ค่าที่แตกต่างกันบ้างในรายงานวิจัยอาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดสาร ความบริสุทธิ์ของสารสกัด สารที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด และสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาทำการทดสอบ

มังคุดและทับทิมเป็นพืชสมุนไพรที่ได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Prashanth *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2003) มังคุดมีส่วนประกอบของแทนนิน 22 ถึง 25% ทับทิมมีแทนนินประมาณ 8.75 ถึง 10.5% สารแทนนินมีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย (Dijipa *et al.*, 2000) จากผลการทดลองพบว่าเบญกานีเป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ได้ดี พืชชนิดนี้ยังไม่มีรายงานวิจัยอื่นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รายงานวิจัยต่อเนื่องจากความร่วมมือของกลุ่มนักวิจัยไทย ญี่ปุ่น และออสเตรเลีย พบว่าพืชนี้มีฤทธิ์เป็นทั้ง bacteriostatic และ bactericidal ต่อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญหลายกลุ่ม อาทิเช่น enterohaemorrhagic *E. coli* O157: H7 (Voravuthikunchai *et al.*, 2004c), *Helicobacter pylori* (Voravuthikunchai *et al.*, 2004a), Redwane *et al.* (1998) รายงานฤทธิ์ในการฆ่าหอย (molluscicidal activity) และ larva ของยุง (Redwane *et al.*, 2002) ส่วนที่ออกฤทธิ์ดีได้แก่ gallotannin (Redwane *et al.*, 2002) เนื่องจากเบญกานีเป็นพืชสมุนไพรที่ราคาไม่แพง สกัดง่าย และให้ % yield สูง งานวิจัยในห้องปฏิบัติการนี้ยังดำเนินต่อเนื่องเพื่อที่จะศึกษาพืชชนิดนี้โดยละเอียด โดยคาดหวังว่าจะได้สารออกฤทธิ์ดีที่จะนำมาพัฒนาใช้เป็นยาต้านแบคทีเรียทางเลือก

ประเทศไทยมีสมุนไพรต่างๆ มากมาย จึงควรได้รับการสนับสนุนจากภาครัฐในการศึกษาวิจัยกันอย่างจริงจัง เพื่อพัฒนาปรับปรุงนำสมุนไพรไทยที่มีประสิทธิภาพในการใช้รักษาโรคติดเชื้อมากขึ้น ตามทัศนะของวงการวิทยาศาสตร์สมัยใหม่เชื่อว่าองค์ความรู้ใหม่จากการค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มที่มีปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ การศึกษาด้านเภสัชวิทยา พิษวิทยา การพัฒนารูปแบบยา และการวิจัยทางคลินิก จะสามารถนำมาพัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยในการรักษาโรคติดเชื้อเหล่านี้

เอกสารอ้างอิง

Bern, J.S. 2003. Infection with antimicrobial-resistant microorganisms in dialysis patients. Semin. Dialysis 16: 30-37.

Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S., and Antolic, A. 1996. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. J. Ethnopharmacol. 52: 119-122.

Dijipa, D.C., Delme, M. and Quetin-Leclercq, J. 2000. Antimicrobial activity of bark extract of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). J. Ethnopharmacol. 71: 307-313.

Leclercq, R., 2002. Gram-positive cocci multiresistant to antibiotics: activity of linezolid. Med. Maladies. Infect., 32: 449-459.

Lorian, V. 1996. Antibiotics in Laboratory Medicines. Fourth edition. Williams and Wilkins, Baltimore.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7th ed. Villanova, PA: NCCLS, Approved standard: M2-A7.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5th ed. Villanova, PA: NCCLS, Approved standard: M7-A5.

Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Leal, I.C.R., Silva, M.G., Amaral, A.C.F., Kuster, R.M. Netto-dosSantos, K.R. 2003. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrobial Agents. 21: 279-284.

Navarro, V., Villarreal, M.L., Rojas, G., and Lozoya, X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment

of infection diseases. J. Ethnopharmacol. 53: 143-147.

Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hitunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. J. Ethanopharmacol. 73: 299-305.

Prashanth, D., Asha, M.K., and Amit, A. 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitotrapia 72: 171-173.

Press, J.B. 1996. Biodiversity: exciting prospects for drug discoverry and development. Meeting report of The Monroe Wall symposium Chemtracts-Organic Chemistry 9: 286-298.

Redwane, A., Markouk, M., Lazrek, H.B., Amarouch, H., and Jana, M. 1998. Laboratory evaluation of molluscicidal activity of extracts from *Cotula cinerea* and *Quercus lusitania* var. *infectoria galls* (Oliv.). Annales Pharmaceutiques Francaises. 56: 274-276.

Redwane, A., Lazrek, H.B., Bouallam, S., Markouk, M., Amarouch, H., and Jana, M. 2002. Larvicidal activity of extracts from *Quercus lusitania* var. *infectoria galls* (Oliv.). J. Ethnopharmacol. 79: 261-263.

Saravalatz, L.D., Pholod, D.J., and Arking, L.M. 1982. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection: A new source from nosocomial outbreak. Ann. Intern. Med. 97: 325-329.

Sherertz, R.J., Reagan, D.V., Hampton, K.D., Robertason, K.L., Streed, S.A., Hoen, H.M., Thomus, R., and Gwaltney, J.M., 1996. A Cloud Adit: The *Staphylococcus aureus* - Virus Interaction Revisited. Annal of Internal Medcine. American College of Physicians - American Society of Internal Medicine.

Tenover, F.C., Biddle, J.W., and Lancaster, M.V. 2001. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 87: 327-332.

Thornsberry, C. 1988. The development of antimicrobial resistant *Staphylococcus*. J. Antimicrob. Chemother. 21 (Suppl.C): 9-16.

Voravuthikunchai, S.P., and Kitpipit, L. 2003. Activities of crude extracts of Thai medicinal plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Glasgow, U.K., May 24-27, 2003: 236.

Voravuthikunchai, S.P., Brusentsev, S., O' Rourke, J., and Mitchell, H. 2004a. Efficacy of crude extracts of Thai medicinal plants on antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains isolated from peptic ulcers. Clin. Microbiol. Infect. 10(1): 334.

Voravuthikunchai, S.P., Popaya, V., and Supawita T. 2004b. Antibacterial activity of crude extracts of medicinal plants used in Thailand against pathogenic bacteria. Ethnopharmacol. 33: 60-65.

Voravuthikunchai, S.P., Lortheeranuwat, A, Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S., and Supawita T. 2004c. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. J. Ethnopharmacol. 94: 49-54.